

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

● 08/913811

PCT/JP97/00153

日 本 国 特 許 庁

12.02.97

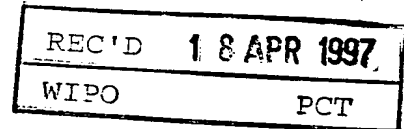
PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日
Date of Application:

1996年 1月24日



出 願 番 号
Application Number:

平成 8年特許願第009857号

出 願 人
Applicant(s):

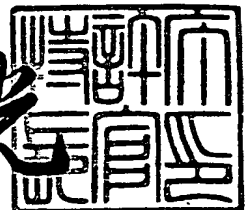
松下電器産業株式会社

PRIORITY DOCUMENT

1997年 4月 4日

特 許 庁 長 官
Commissioner,
Patent Office

荒井寿光



出証番号 出証特平09-3021713

【書類名】 特許願

【整理番号】 2030180002

【提出日】 平成 8年 1月24日

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 B23K 11/30

【発明の名称】 組織または細胞の物理化学的特性測定方法、薬品検査方法およびその装置

【請求項の数】 6

【発明者】

【住所又は居所】 大阪府門真市大字門真1006番地 松下電器産業株式会社内

【氏名】 杉原 宏和

【発明者】

【住所又は居所】 大阪府門真市大字門真1006番地 松下電器産業株式会社内

【氏名】 小林 康

【発明者】

【住所又は居所】 大阪府門真市大字門真1006番地 松下電器産業株式会社内

【氏名】 小川 竜太

【発明者】

【住所又は居所】 大阪府門真市大字門真1006番地 松下電器産業株式会社内

【氏名】 竹谷 誠

【特許出願人】

【識別番号】 000005821

【氏名又は名称】 松下電器産業株式会社

【代表者】 森下 洋一

【代理人】

【識別番号】 100078204

【弁理士】

【氏名又は名称】 滝本 智之

【選任した代理人】

【識別番号】 100097445

【弁理士】

【氏名又は名称】 岩橋 文雄

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 011305

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9308195

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 組織または細胞の物理化学的特性測定方法、薬品検査方法およびその装置

【特許請求の範囲】

【請求項1】 薬品が添加される細胞に電気的特性を検出する端子を取り付けておき、さらに外部から前記細胞の視覚的特性を観測するための画像検出手段を備え、前記細胞に前記薬品を添加した時の、前記細胞の電気的特性および前記細胞の視覚的特性を測定し、これら2つのパラメータから、添加した前記薬品が細胞に対して効能があったかどうかを判定することを特徴とする薬品検査方法。

【請求項2】 薬品が添加される細胞の電気的特性を測定する電気的測定部と、前記細胞の視覚的特性を測定する視覚的特性検出部と、前記電気的特性部および視覚的特性部の出力から前記細胞の活性状態を判定し、前記薬品の有効／無効を判定する薬効判定部とからなる薬品検査装置。

【請求項3】 生物の組織または細胞をとりまく物理化学的環境の変化が、前記組織または細胞の物理化学的特性に及ぼす影響を観測するための方法であって、前記生物の組織または細胞をとりまく物理化学的環境を一定に保つちながら、前記物理化学的環境を任意に変化させ、前記組織または細胞の物理化学的特性を観測し、前記物理化学的環境を変化させる前後での前記組織または細胞の物理化学的特性を比較することにより前記生物の組織または細胞の物理化学的特性測定方法。

【請求項4】 生物の組織または細胞をとりまく物理化学的環境の変化が、前記組織または細胞の物理化学的特性に及ぼす影響を観測するための装置であって、前記生物の組織または細胞をとりまく物理化学的環境を一定に保つための手段と、前記物理化学的環境を任意に変化させるための手段と、前記組織または細胞の物理化学的特性を観測するための手段と、前記物理化学的環境を変化させる前後での前記組織または細胞の物理化学的特性を比較するための手段を持つことを特徴とする組織または細胞の物理化学的特性測定装置。

【請求項5】 物理化学的環境を任意に変化させるための手段が、培養液に任意の化学物質を任意の濃度加えるための手段と、加えた化学物質を除去する手段と

からなる請求項4記載の組織または細胞の物理化学的特性測定装置。

【請求項6】組織または細胞の物理化学的特性を観測するための手段が、組織または細胞の電気生理学的特性を測定するための手段であって、

A.基板上に複数の電極を備え、その上に前記組織または細胞をおくための細胞設置部を備え、前記微小電極に電気信号を付与するとともに前記微小電極からの電気信号を導出するための手段を電気接続手段を備えた一体化細胞設置器と、

B.前記細胞に電気刺激を与えるために前記一体化細胞設置器の電気接続手段に接続される刺激信号付与手段と、

C.前記細胞の電気生理活動による出力信号を処理するために前記細胞設置器の電気接続手段に接続される信号処理手段とを備えている請求項4記載の組織または細胞の物理化学的特性測定装置。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、睡眠薬、風邪薬、避妊薬、目薬等の生物に対して投与される薬品の効力を調べる方法およびその装置に関し、特に生物の組織または細胞に対し、物理化学的環境の変化による、組織または細胞の物理化学的特性を測定するものであり、主として環境科学分野、医療科学分野、薬学分野、食品科学分野そして神経生理学分野で用いられる。

【0002】

【従来の技術】

近年、送電線の設置や携帯電話、コンピュータのモニタ等の電気機器の使用に伴い、強い電磁場や磁場の存在が身近なものとなった。また薬学、食品科学、有機化学等の進歩に伴い、新たな薬剤や食品添加物、従来自然界に存在しなかった化学物質が続々と開発されている。これらの人工的な物理化学環境が生物に及ぼす影響について明らかにするため、主として人間を対象とした統計的手法を用いた調査実験や動物を用いた生体実験がおこなわれてきた。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】

しかしながら統計的手法を用いた調査実験では、実験条件を任意に設定することが困難なため、一般に結果の信頼性は低くなる。また動物を用いた生体実験では、充分信頼のおける実験結果を得るためには試料数を増やす必要がある。しかも実験動物の飼育環境は注意深く管理されねばならず、一般には大がかりな専用飼育設備が使用される。当然、実験にはおびただしい数の動物が必要となり、飼育関連の費用も含めたコストは膨大なものになるという課題があった。

【0004】

例えば、抗ガン剤を開発しようとする、新薬となるべき候補が1000種類存在した場合には、ネズミ等の被試験小動物も1000匹用意し、それぞれにガン細胞を移植、繁殖させ、そのガン細胞に対し新薬候補を投与して、その薬効をみるが行われている。

しかし、これでは、ネズミの個体差の影響、環境のちがい等で、信頼性の限界がある。

【0005】

また、経済的理由だけではなく動物愛護の観点からも、むやみに多数の実験動物を用いて実験をおこなうことは避けるべきである。

そこで、個体から、必要な組織あるいは細胞を生きたまま必要な分量だけとりだし薬効を判定することも考えられるが、長期に渡り、組織または細胞周辺の物理化学的環境を適当に調節し生体活動を維持させたり、環境の変化による細胞の物理化学的特性の変化を時々刻々に観察することは不可能であった。

【0006】

以上の理由から、生物から取り出した組織または細胞の物理化学的特性を時々刻々に観察することができ、組織または細胞周辺の物理化学的環境を一定に維持することができ、しかも実験目的に応じて組織または細胞周辺の物理化学的環境に任意の変化を加えることのできる装置の開発が強く望まれている。

本発明は、かかる要望にかなう薬品の検査方法、組織または細胞の物理化学的特性測定方法および装置を提供することを目的とするものである。

【0007】

【課題を解決するための手段】

上記目的を達成するため本発明は、薬品が添加される細胞に電気的特性を検出する端子を取り付けておき、さらに外部から前記細胞の視覚的特性を観測するための画像検出手段を備え、前記細胞に前記薬品を添加した時の、前記細胞の電気的特性および前記細胞の視覚的特性を測定し、これらの情報から、添加した前記薬品が細胞に対して効能があったかどうかを判定することを特徴とする薬品検査方法である。

【0008】

また、本発明の物理化学的特性測定方法は、生物の組織または細胞をとりまく物理化学的環境を一定に保つための手段と、前記物理化学的環境を任意に変化させるための手段と、前記組織または細胞の物理化学的特性を観測するための手段と、前記物理化学的環境を変化させる前後での前記組織または細胞の物理化学的特性を比較するための手段を持つことを特徴とする。

【0009】

上記構成により、生体から取り出された組織または細胞は、物理化学的環境を一定に保たれた状態で保存される。そして組織または細胞の物理化学的特性が測定される。次に、物理化学的環境の一部または全部を変化させ、再び組織または細胞の物理化学的特性を測定する。物理化学的環境を変化させる前後での、組織または細胞の物理化学的特性を比較することによって、物理化学的環境の変化が組織または細胞に及ぼす影響を明らかにすることができ、薬品の効力判定を行うことが出来る。

【0010】

また好ましくは、物理化学的環境を任意に変化させるための手段が、培養液に任意の化学物質を任意の濃度加えるための手段と、加えた化学物質を除去する手段からなっていれば、その化学物質が組織または細胞に与える影響を簡便に観測することが可能となる。

さらに好ましくは、組織または細胞の物理化学的特性を観測するための手段が、組織または細胞の電気生理学的特性を測定するための手段であって、

A.基板上に複数の電極を備え、その上に前記組織または細胞をおくための細胞設置部を備え、前記微小電極に電気信号を付与するとともに前記微小電極からの

電気信号を導出するための手段を電気接続手段を備えた一体化細胞設置器と、

B.前記細胞に電気刺激を与えるために前記一体化細胞設置器の電気接続手段に接続される刺激信号付与手段と、

C.前記細胞の電気生理活動による出力信号を処理するために前記細胞設置器の電気接続手段に接続される信号処理手段とを備えている。このような好ましい状態とすることにより、例えば概略以下のような測定が可能となる。

【0011】

一体化細胞設置器の細胞設置部に試料である組織または細胞がセットされ、複数の微小電極が組織または細胞に接触する。刺激信号付与手段によって電気接続手段を介して複数の微小電極のうちの任意の一对の電極間に刺激信号を印可する。他の各電極に得られる誘発電位の時間変化が電気接続手段を介して信号処理手段に与えられ、必要な信号処理を経て例えば表示装置に出力されるとともに、記憶装置に蓄えられる。次に物理化学的環境を変化させ同様の測定をおこなう。そして記憶装置に蓄えられた物理化学的環境を変化させる以前の測定結果を呼び出し、物理化学的環境を変化させた後の測定結果と比較する。なお、刺激信号を与えない自発電位の測定も同様にしておこなわれる。

【0012】

【発明の実施の形態】

以下本発明の実施例を図面に基づいて説明する。

本発明に使用する一体化細胞設置器は、図1に斜視図を、図2に組立図をそれぞれ示すように、ガラスプレートに複数の微小電極及びその引出しパターンが設けられた一体化複合電極2、それを上下から挟んで固定する2分割ホルダ3、4、及び、このホルダを固定するプリント配線板5からなる。

【0013】

一体化複合電極は、図3に示すように厚さ1.1mm、大きさ50mm角の透明パイレックスガラスからなる基板の中央部に64個の微小電極11が8×8のマトリックス状に形成され、各微小電極には引出し用導電パターン12が接続されている。各電極11は50μm角（面積 $25 \times 10^2 \mu\text{m}^2$ ）であり、隣接する電極の中心間距離は150μmである。また基板の4辺には、各々16個、計64

個の電気接点7が形成され（図2参照）、これらの電気接点と基板中央部の64個の微小電極とが1対1で対応するように引出し用導電パターン12で接続されている。各辺の16個の電気接点はピッチ1.27mmで並んでいる。さらに、内径22mm、外径25mm、高さ10mmの円筒状ガラス枠6（図2参照）をガラスプレートにシリコン系接着剤を用いて接着する。この円筒状ポリスチレン枠はガラスプレートの中心、すなわち64個の微小電極の中心部と中心合わせした状態で固定され、このポリスチレン枠の内側が細胞設置部に相当する。

【0014】

以上のように構成された一体化細胞設置器1を用いて構成した細胞電位測定装置の好適な実施例を図4に示す。本実施例の測定装置は、上述した一体化細胞設置器1と、この一体化細胞設置器1にセットされた細胞を光学的に観察するための倒立顕微鏡21を含む光学観察手段20と、細胞への刺激信号を付与する手段及び細胞からの出力信号を処理する手段を含むコンピュータ30と、細胞の培養雰囲気を維持するための細胞培養手段40と、培養液に任意の化学物質を任意の濃度加えたり加えた化学物質を除去するための化学環境制御手段50を備えている。

【0015】

光学観察手段20には、一体化細胞設置器1がセットされる倒立顕微鏡21（オリンパス製IMT-2-F又はIX70相当品）の他に、顕微鏡用のSITカメラ（浜松ホトニクス製C2400-08相当品）22、高精細度ディスプレイ23、及び画像ファイル装置（松下電器製TQ-2600又はFTQ-3100F相当品）24が含まれている。但し、高精細度ディスプレイはコンピュータ30のディスプレイを兼用してもよい。尚、上記の括弧内に示した具体的な装置は一例であり、これらに限られるものではない。以下同様である。

【0016】

コンピュータ30には、WINDOWS対応のパーソナルコンピュータにA/D変換ボード及び測定用ソフトウェアを搭載したものが使用される。A/D変換ボードは図9のA/D変換器31とD/A変換器32を含んでいる。A/D変換器31は16ビット64チャンネルであり、D/A変換器32は16ビット8チ

チャンネルである。

【0017】

測定用ソフトウェアは刺激信号付与の条件や得られた検出信号の記録条件を設定するためのソフトウェアを含んでいる。この測定用ソフトウェアによって、コンピュータ30は細胞に刺激信号を付与する手段と、細胞から検出された信号を処理する手段とを構成するだけでなく、光学観察手段（SITカメラ及び画像ファイル装置）や細胞培養手段の制御をも司る。以下に、測定用ソフトウェアの主な仕様を画面ごとに説明する。

【0018】

パラメータ設定画面では、キーボード又はマウスを用いて画面上で刺激波形を描くことにより、複雑な刺激条件の設定が可能である。また、記録条件の設定は、入力チャンネル数64、サンプリングレート10kHzで数時間の連続記録に対応できるようにしている。さらに、刺激信号を付与する電極や細胞からの検出信号を取り出す電極の指定に関しては、画面上に表示された顕微鏡像をマウスやペンで指示することにより指定できるようにしている。その他、細胞培養手段40の温度やpH等の諸条件の設定および化学環境制御手段50のバルブの切り替えやポンプのオン、オフさらにはポンプの流速等の諸条件の設定をキーボードを用いて行うことができる。

【0019】

記録画面では、細胞から検出された自発活動電位又は誘導電位をリアルタイムで最大64チャンネル表示する。

以上のようなコンピュータ30から刺激信号が出力される場合、この刺激信号はD/A変換器32及びアイソレータ（BAK ELECTRONICS社製BSI-2相当品）33を経て細胞に与えられる。つまり、一体化細胞設置器1の64個の微小電極11のうちの選択された2点間に刺激信号が印加される。そして、各微小電極11とGNDレベル（培養液の電位）との間に生ずる誘発電位は、64チャンネル分の高感度増幅器（日本光電AB-610J相当品）34及びA/D変換器31を経てコンピュータ30に入力される。

【0020】

次に、細胞培養手段40には、温度調節器41と、空気及び二酸化炭素の混合ガスを供給する手段42とが備えられている。実際には、Medical Systems社製のマイクロインキュベータPDMI-2相当品と温度コントローラTC-202相当品、そして、CO₂ポンプ等を用いて細胞培養手段40が構成される。このマイクロインキュベータはペルチェ素子によって0～50℃の温度範囲に制御することができ、液送速度3.0ml/min以下、給気速度1.0ml/min以下に対応する。あるいは、温度コントローラを内蔵しているマイクロインキュベータ（オリンパス社製IMT2-IBSV）を用いてもよい。

【0021】

そして、化学環境制御手段50には、溶液瓶51、溶液瓶52、バルブ53、ポンプ54およびポンプ55が備えられている。溶液瓶51には通常の培養に用いる培養液が、溶液瓶52には前記培養液に任意の化学物質を任意の濃度溶解した溶液、すなわち試料溶液が入れられている。バルブ53を切り替えることによって、一体化細胞設置器4にポンプ54で送液される溶液を、培養液もしくは試料溶液のいずれかに設定することが可能である。そしてポンプ54と同じ流速に設定され、かつ同期して作動するポンプ55が、一体化細胞設置器4内の溶液を吸引する。このようにして一体化細胞設置器4内の溶液量を常に一定に保ちながら溶液の組成を変化させることが可能である。

【0022】

以上のような組織または細胞の物理化学的特性測定装置を用いて、実際に一体化細胞設置器上で培養された神経細胞又は組織に物理化学的環境の変化を加え、その前後での組織または細胞の物理化学的特性の変化を測定した例について以下に説明する。神経組織としてラット大脳皮質の切片を用い、後述する培養法実施例に示す方法で培養した。また、物理化学的環境変化としては、培養液中に覚醒剤の一種であるメタンフェタミンを加えた。さらに、組織または細胞の物理化学的特性としては、細胞の電気生理学的特性すなわち刺激信号を与えた際の誘発電位を測定した。

【0023】

なお、細胞の培養に先立って、一体化複合電極の各電極と細胞との接着性を高

める目的で、一体化複合電極の表面を厚さ50 μ m以下のコラーゲンゲルで覆った。そして、コラーゲンゲル上に、かつ、微小電極上に位置するようにラット大脳皮質の切片（厚さ500 μ m以下）を置いて培養した。図5に、培養6日目に培地中に各種濃度のメタンフェタミンを加えて、30分経過後に測定した誘発電位を、図6に培養3日目にメタンフェタミンを加えて、3日後に測定した誘発電位を、各々メタンフェタミン添加前の誘発電位とともに示す。すなわち図5はメタンフェタミンの急性効果を表し、図6は慢性効果を表している。

【0024】

急性効果については（図5参照）、0.1 mMのメタンフェタミンは誘発電位に影響を及ぼさなかった。0.5 mMのメタンフェタミンを添加すると誘発電位は振幅がやや小さくなり、1 mMでは、誘発電位はほぼ消滅した。その後、溶液中のメタンフェタミンを除去し通常の培地組成に戻したところ、誘発電位はほぼもとの状態に復帰した。

【0025】

慢性効果については（図6参照）、0.1 mMのメタンフェタミンの添加に伴い誘発電位は完全に消滅した。この濃度は、急性的には誘発電位に影響をおよぼさなかった濃度である。また、その10分の1の濃度である0.01 mMであっても、やはり誘発電位は消滅した。さらに、メタンフェタミンを除去しても誘発電位は復帰しなかった。

【0026】

〔大脳皮質培養法実施例〕

（1）培地

ダルベッコ改変イーグル培地とハムF12培地の1：1混合培地（GIBCO Co., LTD. 430-2500EB）に、以下の添加物を加えて用いた。

* グルコース（glucose, GIBCO 820-5023IN）2.85mg/L

（上記培地にもともと含まれているものと合わせて、トータル6mg/Lになる）

* プトレシン（putrescine, SIGMA Co., LTD. P5780）100 μ M

* プロジェステロン（progesterone, SIGMA P8783）20nM

* ハイドロコルチゾン（hydrocortisone, SIGMA H0888）20nM

- * 亜セレン酸ナトリウム (sodium selenite, WAKO Co., LTD. 198-0319) 20nM
- * インシュリン (insulin, SIGMA 16634) 5mg/L
- * トランスフェリン (transferrin, SIGMA T1147) 100mg/L
- * 重炭酸ナトリウム 2.438mg/L
- * 1N HCl又は1N NaOHを適量加え、pH7.4に調整する。

【0027】

以上の添加物を加え濾過殺菌した後、4℃で保存し使用に備えた。以下、本培地を、単に「培地」と呼ぶ。

(2) 一体化複合電極上のウエルの構成

一体化複合電極上での神経細胞または神経組織の培養の便を図るため、内径22mm、外径25mm、高さ10mmのガラス製円筒を、以下に記載する方法で接着した。

【0028】

(イ) ガラス製円筒（内径22mm、外径25mm、高さ10mm）の下面に、1液性シリコン系接着剤（ダウコーニング891または信越化学KE-42RTV）を必要十分量塗布する。

(ロ) 一体化複合電極のガラス基板中心とポリスチレン製円筒の中心が一致するように注意しながら、両者を接着する。

【0029】

(ハ) 埃の入りにくい環境で24時間放置することにより、接着剤を固化させる。

(ニ) 70%エタノールに5分漬けた後クリーンベンチ内で風乾することによって滅菌を行い、電極表面の処理に備える。

(3) 電極表面の処理

一体化複合電極表面の細胞接着性を高めるため、以下の方法で電極表面にコラーゲンゲルを構成した。以下の操作は、全て無菌的雰囲気下で行った。

【0030】

(イ) 以下のA, B, Cの溶液を用意し、氷冷しておく。

- A. 0.3vol.%希塩酸コラーゲン溶液 (pH3.0, 新田ゼラチン Cellmatrix TypeI-A)
- B. ダブルベッコ改変イーグル溶液とハムF12培地の1:1混合培地 (GIBCO 4

30-2500EB)に重炭酸ナトリウムを加えないで、通常用いる際の10倍濃度の液を作り、濾過滅菌したもの

C. 0.05N 水酸化ナトリウム溶液100mLに対し、重炭酸ナトリウム2.2g, HEPES(GIBCO 845-1344IM)4.77gを溶かし、濾過滅菌したもの

(ロ) 冷却しながら、A,B,C液を8:1:1の割合で混合する。この際、AとBをよく混合した後にCを加え、さらに混合する。

【0031】

(ハ) あらかじめ4℃程度に冷却しておいた一体化複合電極のウェル内に、(ロ)の混合溶液1mLを分注し、電極表面をまんべんなく覆わせた後、ガラスパスツールピペットで混合溶液をできる限り取り除く。この操作により、電極表面上に厚さ50μm以下の混合用液の被膜が構成される。

(ニ) 混合用液被膜を構成した一体化複合電極を37℃で30分間暖めることにより、混合用液をゲル化させ、コラーゲンマトリクスを構成する。

【0032】

(ホ) 一体化複合電極のウェル内に滅菌水1mLを加え、約5分間放置した後取り除くことにより洗浄を行う。

(ヘ) (ホ)の操作を、あと2回(計3回)繰り返す。

(ト) 一体化複合電極のウェル内に、ダルベッコ改変イーグル培地とハムFH12培地の1:1混合培地(GIBCO 430-2500EB)に上記の添加物を加えたもの(ただしインシュリンとトランスフェリンを除く)1mLを分注し、温度37℃、相対湿度97%以上、CO₂濃度5%、空気濃度95%に保ったCO₂インキュベーター内に保存し、使用に備える。

【0033】

(4) 神経細胞または神経組織の培養

培養形態は大まかに2種類に分けられる。すなわち、神経細胞の分散培養と神経組織の器官培養である。以下、各々について述べる。

(4-1) ラット大脳皮質視覚野神経細胞の分散培養法

以下の操作は、全て菌的雰囲気下で行った。

【0034】

(イ) 妊娠後16～18日を経過したSDラットの胎児の脳を摘出し、氷冷したハंकス平衡塩液(GIBCO 450-1250EB)に浸す。

(ロ) 氷冷ハंकス平衡塩液中の脳から視覚皮質を切り出し、トル最小必須培地(GIBCO 410-1100EB)液中に移す。

(ハ) イーグル最小必須培地液中で、視覚皮質をできるだけ細かく、最大でも0.2mm角となるように切断する。

【0035】

(ニ) 細かく切断した視覚皮質を遠心分離用試験管に入れ、カルシウムおよびマグネシウムを含まないハंकス平衡塩液で3回洗浄した後、適量の同液中に分散する。

(ホ) 上記(ニ)の遠心分離用試験管中に、0.25%のトリプシンを溶解したカルシウム及びマグネシウムを含まないハंकス平衡塩液を加え、全量を倍にする。緩やかに攪拌しながら、37℃で15分間恒温状態に保ち、酵素反応を行わせる。

【0036】

(ヘ) 前記(1-1)で示した培地(添加物含む。以下、「培地」と略す)に、さらに10vol.%の牛胎児血清を加えたものを、上記ホ)を経た遠心分離用試験管に中に加え、全量をさらに倍にする。先端をバーナーであぶり口径を小さくしたガラスパスツールピペットで、緩やかにピペッティングを繰り返し(最大20回程度)、個々の細胞を単離する。

【0037】

(ト) 9806.65 m/sec^2 (すなわち1000g)で5分間遠心分離を行った。遠心分離終了後、上清を捨て、沈殿を5%の牛胎児血清を含む培地に懸濁する。

(チ) 前記(ト)をあと2回(計3回)繰り返す。

(リ) 最終的の得られた沈殿を、5vol.%の牛胎児血清を含む培地に懸濁し、懸濁液中の細胞濃度を赤血球計数板を用いて計測する。計測後、同様の培地を用いて細胞濃度が $2 \sim 4 \times 10^6$ 個/mlになるように調整する。

【0038】

(ヌ) 前記(1-3)の処理を経た後 CO_2 インキュベータ内に保存しておいた一体化複合電極を取り出し、ウェル内の培地(ただしインシュリンおよびトランスフェリンを含まない)を取り去り、新たに5 vol.%の牛胎児血清を含む培地 $500\mu\text{L}$ を分注する。さらに、(リ)の細胞濃度調整後の細胞懸濁液 $100\mu\text{L}$ を静かに加え、再び CO_2 インキュベータ内に静置する。

【0039】

(ル) 前記(ヌ)の操作より3日後に、培地の半量を新しいものと交換する。交換する培地は牛胎児血清を含まない培地を用いた。牛胎児血清の濃度を低くすることによって、神経細胞以外の細胞(例えばクリア細胞)の増殖を抑える。

(ヲ) 以後1~2日毎に上記と同様の培地交換を行う。

(4-2) ラット大脳皮質切片培養法

(イ) 生後2日目のSDラットから、脳を取り出し、氷冷した0.25 vol.% D-グルコース入りハンクス平衡塩液に浸す。

【0040】

(ロ) 氷冷した0.25 vol.% D-グルコース入りHBSS中で、脳に付着している脳膜を、大脳皮質を傷つけないように注意しながら、先の鋭利なピンセットを用いて除く。

(ハ) 脳膜を除いた大脳皮質の片側の脳梁から $500\mu\text{m}$ 程度のところを、眼科手術用の微小ハサミを用いて、脳梁にそって後頭葉側から前頭葉側に向かって切断する。

【0041】

(ニ) 続いて、眼科手術用の微小ハサミを用いて、(ハ)の切断面に垂直に $200\sim 300\mu\text{m}$ の厚さで大脳皮質を切断し、切片を作る。

(ホ) さらに、眼科手術用の微小ハサミを用いて、切片の大きさを 1×1 程度に調整する。

(ヘ) 前述の「(3) 電極表面の処理」で用意しておいた一体化複合電極を CO_2 インキュベータから取り出し、大きさを調整した大脳皮質切片を口径 2mm 以上のピペットで傷つけないように静かに吸い取り、一体化複合電極の培養用ウェル中に移す。

【0042】

(ト) バーナーであぶり先端を滑らかにしたパスツールピペットを用い、大脳皮質切片を傷つけないように注意しながら、皮質の層構造が上面を向きかつ電極上に位置するように調整する。

(チ) 大脳皮質切片を一体化複合電極上にのせた後、培地の量を調整し、切片の底面が培地に触れ、上面が外気に触れる状態にする。

【0043】

(リ) 培地量の調整後、一体化複合電極を滅菌ペトリ皿に入れ、培地の乾燥を防ぐために37℃の滅菌水約5mlをペトリ皿に分注し、再びCO₂インキュベーター内に静置する。

(ヌ) 以降、培地の量に注意し、毎日1回の培地交換を行った。培地の量については、上記(チ)と同様とする。

【0044】

本実施例によれば、メタンフェタミンが細胞に対して、どの程度効果を有しているのかを、電氣的、視覚的にとらえることが出来、薬品のスクリーニングとしては、非常によい結果が得られた。

なお、本実施例では、細胞に投与する薬品としてメタンフェタミンを用いたが、その他、解熱剤、睡眠薬等、別の薬効があると思われる薬品に対しても同様の観測により、その薬品の効力を判定することが出来る。

【0045】

【発明の効果】

以上、説明したように、本発明の薬品の検査方法、組織または細胞の物理化学的特性測定方法および装置によれば、生物個体から必要な組織あるいは細胞を生きたまま必要な分量だけとりだし、組織または細胞周辺の物理化学的環境を適当に調節することにより、環境の変化による細胞の物理化学的特性の変化を時々刻々に観察することができ、強い電磁場や磁場、従来自然界に存在しなかった化学物質等の人工的な物理化学環境が生物組織に及ぼす影響について明らかにする際、実験効率を著しく向上させることができる。また、極力少数の実験動物を用いて実験をおこなうことが可能で、動物愛護の観点からも極めて意義が大きい。

【図面の簡単な説明】

【図 1】

本発明の一実施例に係る細胞電位測定装置に使用される一体化細胞設置器の斜視図

【図 2】

一体化細胞設置器の組立図

【図 3】

一体化細胞設置器を構成する一体化複合電極の中央部に設けられた 64 個の微小電極及び引出しパターンを示す平面図

【図 4】

本発明の一実施例に係る細胞電位測定装置のブロック構成図

【図 5】

本発明の装置を用いて測定された、メタンフェタミンが培養細胞の誘発電位に及ぼす急性効果を示す図

【図 6】

本発明の装置を用いて測定された、メタンフェタミンが培養細胞の誘発電位に及ぼす慢性効果を示す図

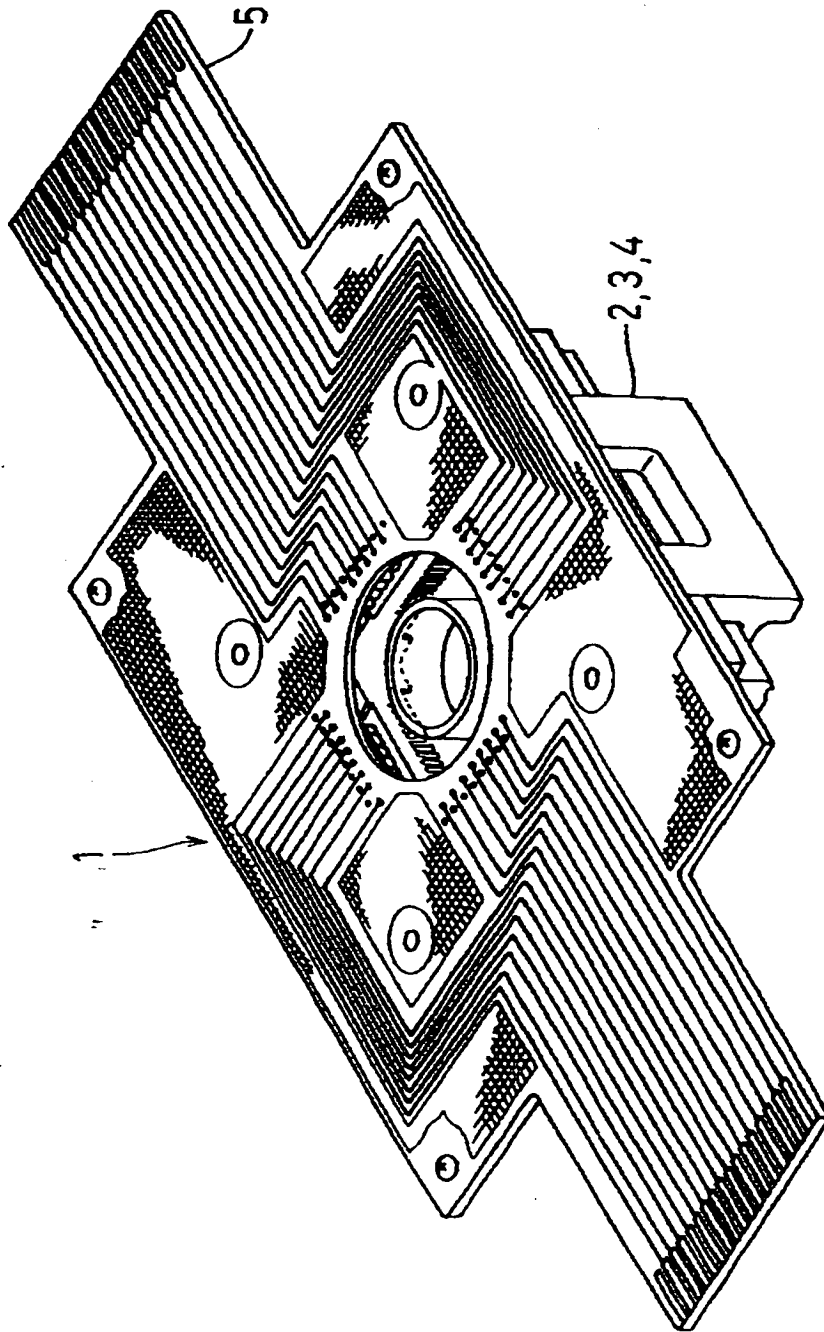
【符号の説明】

- 1 一体化細胞設置器
- 2 一体化複合電極
- 3 上部ホルダ
- 4 下部ホルダ
- 5 プリント配線板
- 6 ガラス枠
- 11 微小電極
- 12 導電パターン
- 20 光学観察手段
- 21 倒立顕微鏡
- 22 SITカメラ

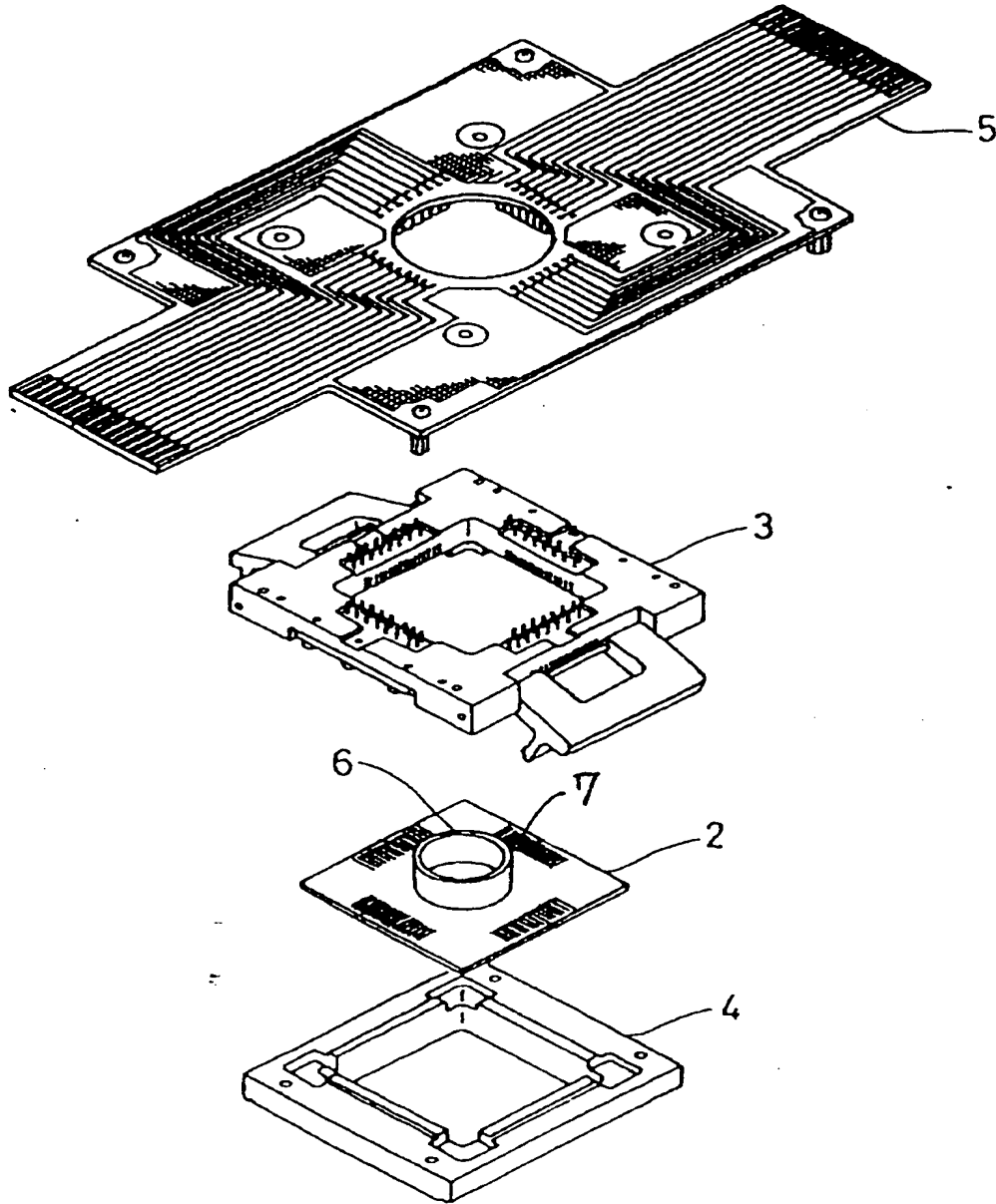
- 24 画像記憶装置
- 30 コンピュータ
- 31 A/D変換器
- 32 D/A変換器
- 33 アイソレータ
- 34 多チャンネル増幅器
- 40 細胞培養手段
- 50 化学環境制御手段

【書類名】 図面

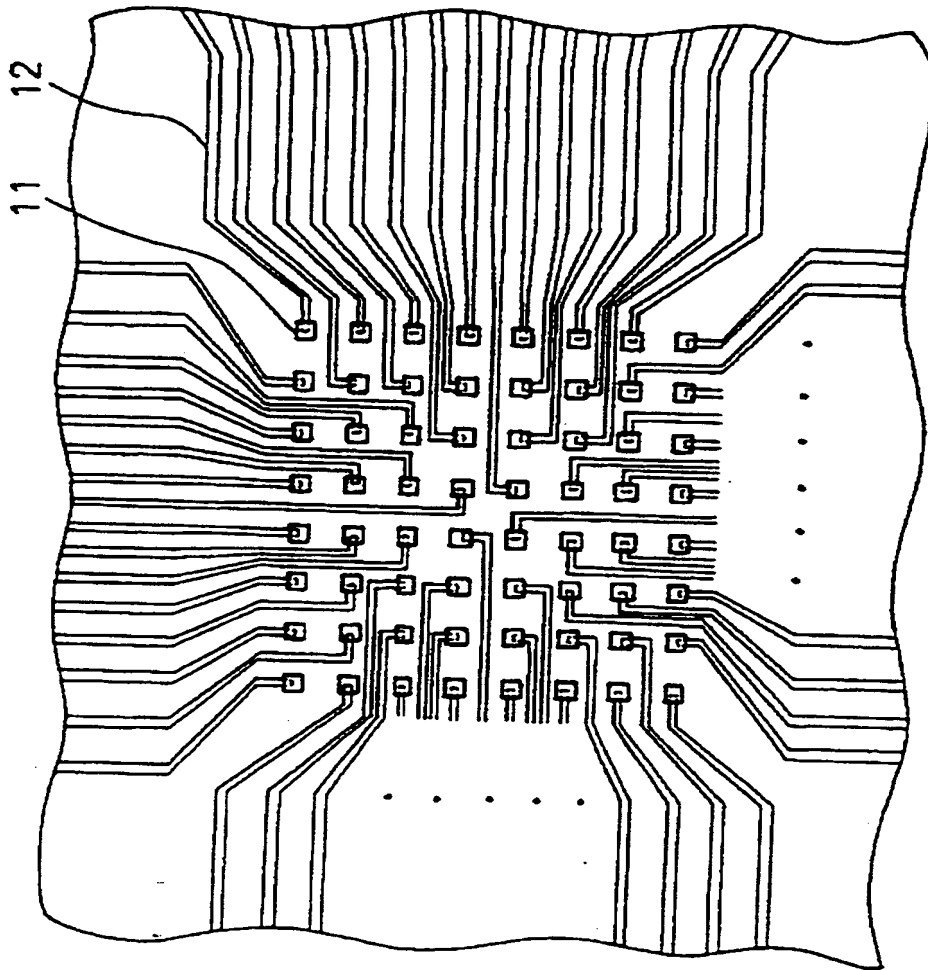
【図1】



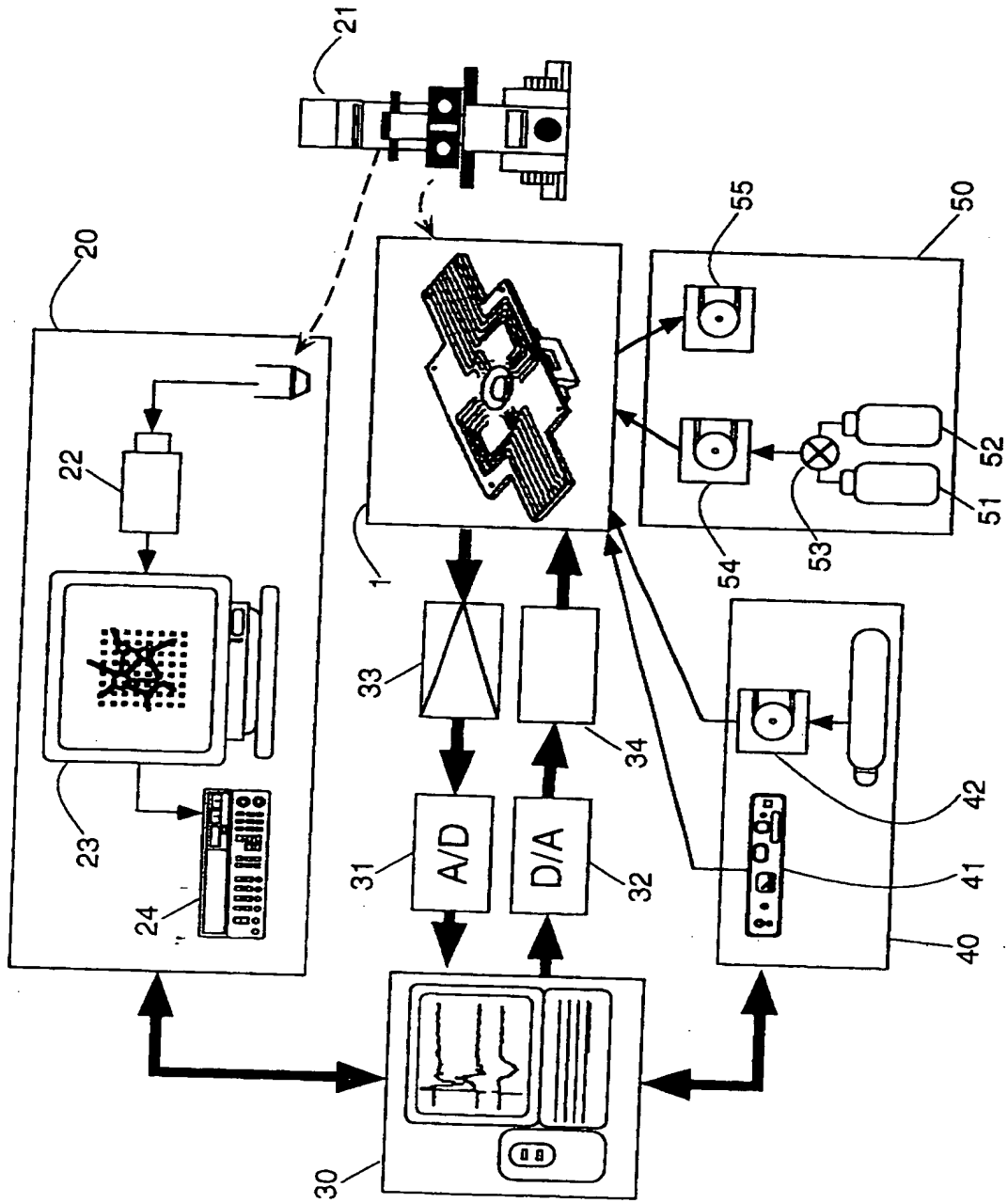
【図2】



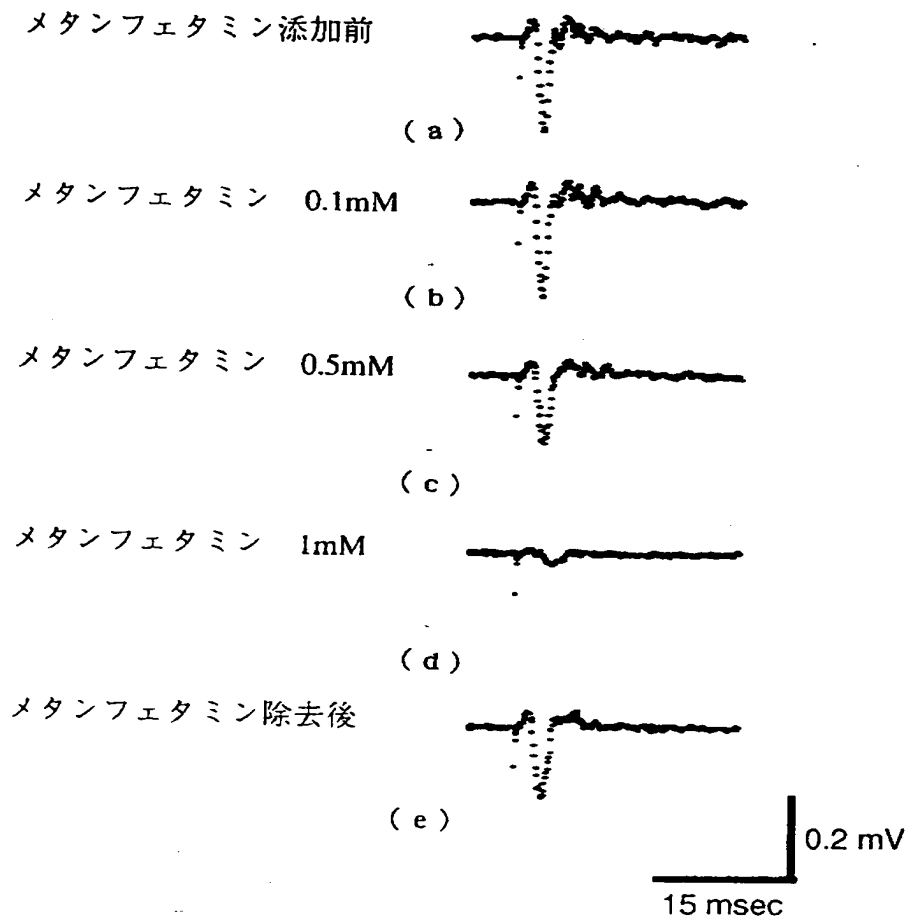
【図3】



【図4】

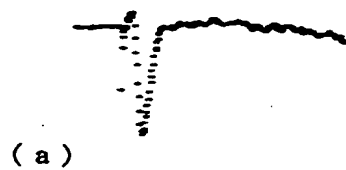


【図5】

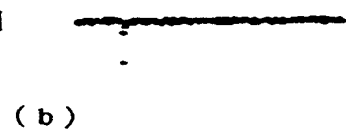


【図6】

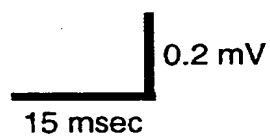
メタンフェタミン添加前



メタンフェタミン 0.01mM



メタンフェタミン 0.1mM



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 実験目的に応じて組織または細胞周辺の物理化学的環境に任意の変化を加えることのできる組織または細胞の物理化学的特性測定方法および装置を提供すること。

【解決手段】 生物の組織または細胞をとりまく物理化学的環境を一定に保つための手段40と、前記物理化学的環境を任意に変化させるための手段50と、前記組織または細胞の物理化学的特性を観測するための手段1と、前記物理化学的環境を変化させる前後での前記組織または細胞の物理化学的特性を比較するための手段20を持つことを特徴とする。

【選択図】 図4

【書類名】 職権訂正データ
【訂正書類】 特許願

<認定情報・付加情報>

【特許出願人】

【識別番号】 000005821

【住所又は居所】 大阪府門真市大字門真1006番地

【氏名又は名称】 松下電器産業株式会社

【代理人】 申請人

【識別番号】 100078204

【住所又は居所】 大阪府門真市大字門真1006 松下電器産業株式
会社内

【氏名又は名称】 滝本 智之

【選任した代理人】

【識別番号】 100097445

【住所又は居所】 大阪府門真市大字門真1006番地 松下電器産業
株式会社内

【氏名又は名称】 岩橋 文雄

特平 8-009857

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000005821]

1. 変更年月日	1990年 8月28日
[変更理由]	新規登録
住 所	大阪府門真市大字門真1006番地
氏 名	松下電器産業株式会社